Die

Bernsteinsäure

als

Product der alkoholischen Gährung zucker-haltiger Flüssigkeiten,

nebst

Studien über die quantitative Bestimmung derselben.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doctorwürde

bei der

medicinischen Facultät der Universität Erlangen

eingereicht von

Alfred Rau.

München 1892.

Druck von R. Oldenbourg.

Die

Bernsteinsäure

als

Product der alkoholischen Gährung zucker-haltiger Flüssigkeiten,

nebst

Studien über die quantitative Bestimmung derselben.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doctorwürde

bei der

medicinischen Facultät der Universität Erlangen

eingereicht von

Alfred Rau.

München 1892.

Druck von R. Oldenbourg.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535708_0123

Die Bernsteinsäure als Product der alkoholischen Gährung zuckerhaltiger Flüssigkeiten, nebst Studien über die quantitative Bestimmung derselben.

Unter den Producten der alkoholischen Gährung zuckerhaltiger Flüssigkeiten sind es die Mengen von Bernsteinsäure, welche ein besonderes Interesse beanspruchen, namentlich mit Rücksicht darauf, ob die Bildung von Bernsteinsäure und Glycerin immer in bestimmtem Verhältniss stattfindet, oder aber, ob die Bernsteinsäure unabhängig von der Glycerinbildung durch den Gährungsprocess entsteht.

Mit diesen Fragen hat sich Pasteur [1]) eingehend beschäftigt und kam dabei zu folgenden Resultaten:

Aus 100 g Zucker erhielt er durch die Gährung 0,673 g Bernsteinsäure und 3,640 g Glycerin als Durchschnittszahl unter den verschiedensten Bedingungen.

Da nun die Formeln von Bernsteinsäure, $C_4 H_6 O_4$, und Glycerin, $C_3 H_8 O_3$, bei der Addition eine den Verhältnissen des Zuckers entsprechende Formel, $C_7 H_{14} O_7$ ergeben, so müsste aus dem Zucker direkt Bernsteinsäure und Glycerin nach den Moleculargewichtszahlen, 118:92, entstehen.

---

1) Annales de Chimie et de Physique, 3ème série 1860. Tome 58, p. 330.

Da nun aber nach den quantitativen Bestimmungen die gebildete Bernsteinsäure zum Glycerin sich ungefähr verhält wie 1 : 5, so musste, wenn wirklich die Bildung dieser beiden Producte im Zusammenhang steht, noch nebenbei ein dritter Körper entstehen, wodurch die im Verhältniss zum Glycerin so geringe Bildung von Bernsteinsäure erklärt wird.

Pasteur nahm deshalb an, dass neben Glycerin und Bernsteinsäure aus dem Zucker sich auch noch Kohlensäure bildet und stellte für diesen Vorgang folgende Formel auf:

$49\ C_{12}H_{22}O_{11} + 109\ H_2O$ geben $24\ C_4H_6O_4 + 144\ C_3H_8O_3 + 60\ CO_2$.

Es müssten also nach dieser Formel die Mengen der Bernsteinsäure zum Glycerin immer ungefähr im Verhältniss von 1 : 5 stehen. Nach den Versuchen von Pasteur sind trotz der verschiedenartigsten Bedingungen, unter welchen er seine Zuckerlösungen vergähren liess, die Unterschiede zwischen den gebildeten Mengen von Bernsteinsäure und ebenso von Glycerin ziemlich geringe; die beiden Körper selbst stehen jedesmal annähernd im Verhältniss von 1 : 5. Es durfte also wohl angenommen werden, dass bei der Gährung zuckerhaltiger Flüssigkeiten ein kleiner Teil des Zuckers statt in Alkohol und Kohlensäure sich in Glycerin und Bernsteinsäure umsetzt.

Nach V. Thylmann und A. Hilger[1]) weisen jedoch vergohrene Flüssigkeiten eine ziemliche Differenz in dem Gehalt an Glycerin auf, je nachdem die Vergährung bei höherer oder niederer Temperatur, bei Luftzutritt oder Luftabschluss, mit oder ohne Zusatz von Nährsubstanz vorgenommen wird. Es war desshalb von Wichtigkeit, Versuche in der Hinsicht vorzunehmen, ob der Bernsteinsäuregehalt bei diesen unter verschiedenen Bedingungen ausgeführten Vergährungen den Schwankungen des Glyceringehalts folgt oder ob der Gehalt an Bernsteinsäure unter verschiedenen Bedingungen ziemlich gleich bleibt.

Zu diesem Zwecke kam es sehr darauf an, eine möglichst genaue Methode für die Bestimmung der Bernsteinsäure ausfindig

1) Archiv für Hygiene. Bd. VIII. 451.

zu machen. Nach Pasteur[1]) wird die Bestimmung der Bernsteinsäure auf folgende Art ausgeführt:

Die zur Syrupdicke abgedunstete Flüssigkeit wird wiederholt mit Aetheralkohol ausgezogen, der Auszug unter Zusatz von etwas Wasser vom Aether und Alkohol befreit. Der Rückstand wird zur Trockene gebracht und zuerst mit Aether-Alkohol, dann mit Alkohol ausgewaschen, bis ein weisser krystallinischer Rückstand zurückbleibt, der getrocknet und gewogen wird. Das so erhaltene Kalksalz der Bernsteinsäure wird jedoch noch immer mit den Kalksalzen anderer bei der Gährung sich bildender organischer Säuren verunreinigt sein, da die letzteren durch das Abdampfen nicht vollständig entfernt werden; speciell für die Bestimmung der Bernsteinsäure im Wein eignet sich die Methode nicht, weil auf diese Weise eine Trennung der Bernsteinsäure von Aepfelsäure und Weinsäure nicht möglich ist.

Nach J. Macagno[2]) wird die betreffende Flüssigkeit mit frisch gefälltem Bleihydroxyd digerirt, zur Trockene verdampft und zur Entfernung des Glycerins mit absolutem Alkohol ausgezogen. Die Bleisalze werden hierauf mit 10%iger wässriger Ammoniumnitrat-Lösung ausgekocht, hierauf wird zur Entfernung des Bleies Schwefelwasserstoff eingeleitet. Nach dem Filtriren wird die Lösung durch Erhitzen vom Schwefelwasserstoff befreit, mit Ammoniak neutralisirt und zur Fällung der Bernsteinsäure mit Eisenchlorid versetzt. Eine genaue quantitative Bestimmung der Bernsteinsäure im Wein dürfte nach dieser Methode nicht möglich sein, da die Anwesenheit von Aepfelsäure und Weinsäure der Fällung mittelst Eisenchlorid Schwierigkeiten bereitete, wie weiter unten bei den Fällungsversuchen nachgewiesen wurde.

Nach R. Kayser[3]) werden 200 ccm Wein zur Hälfte eingedampft und alsdann Weinsäure und Phosphorsäure durch Kalkwasser herausgeschafft. Nach Entfernung des Kalks durch Kohlensäure wird aus der neutralen Flüssigkeit die Bernsteinsäure durch

1) Annales de Chimie et de Physique, 3ème série 1860. Tome 58, p. 334.
2) Ber. der deutsch. Chem. Gesellschaft 8, 257.
3) Repert. der anal. Chemie 1881, 14, 209.

Eisenchlorid gefällt, der Niederschlag mit 70 %igem Weingeist gewaschen und nach dem Trocknen geglüht und gewogen. Das so erhaltene Eisenoxyd soll in der Weise in Bernsteinsäure umgerechnet werden, dass zwei Moleküle Eisenoxyd drei Molekülen Bernsteinsäure entsprechen. Die mittelst dieser Methode in verschiedenen Weinen vorgenommenen Bernsteinsäurebestimmungen ergaben folgende Zahlen:

Frankenwein	1876er	= 1,1	Bernsteinsäure	im	Liter
„	1877er	= 0,98	»	»	»
Deidesheimer	1876er	= 1,22	»	»	»
Rüdesheimer	1876er	= 1,04	»	»	»
St. Julien	1876er	= 1,24	»	»	»
„	1877er	= 0,90	»	»	»
Barletta	1878er	= 1,28	»	»	»
Bari	1878er	= 1,08	»	»	»

Auch bei dieser Bestimmung ist die Anwesenheit der Aepfelsäure für eine genaue Bestimmung der Bernsteinsäure hinderlich. Für die Fällung der Bernsteinsäure durch Eisenchlorid und die daraus folgende Berechnung, dass zwei Moleküle Eisenoxyd drei Molekülen Bernsteinsäure entsprechen, stellt Kayser folgende Formel auf:

$$3\ Ca\,C_4\,H_4\,O_4 + 2\,(Fe_2\,Cl_3) + H_2\,O = 2\,(Fe_2\,C_4\,H_4\,O_6) + C_4\,H_6\,O_4 + 3\,Ca\,Cl_2.$$

Diese Formel ist, wie Fresenius [1]) nachweist, nicht richtig, sie heisst:

$$3\,(Ca\,C_4\,H_4\,O_4) + Fe_2\,Cl_6 + 2\,H_2\,O = Fe_2\,(OH)_2\,(C_4\,H_4\,O_4)_2 + C_4\,H_6\,O_4 + 3\,Ca\,Cl_2.$$

Infolgedessen muss die Berechnung so ausgeführt werden, dass ein Molekül Eisenoxyd drei Molekülen Bernsteinsäure entspricht.

Schmidt und Hilpe [2]) geben folgende Methode für die Bestimmung der Bernsteinsäure im Wein an:

1) Zeitschr. f. anal. Chemie 21. Jahrg. 1882. S. 424.
2) Zeitschr. f. anal. Chemie 21. Jahrg. 1882. S. 539.

Die Säuren werden aus dem Wein mittelst Bleiacetat gefällt und das Blei aus dem Niederschlag durch Schwefelwasserstoff entfernt. Nach dem Verjagen des Schwefelwasserstoffs wird die Lösung mit Kali neutralisirt und nach Zusatz von essigsaurem Kalk 4—6 Stunden bei Seite gesetzt, um Weinsäure und Phosphorsäure abzuscheiden.

Das Filtrat wird hierauf mit Alkohol versetzt, der entstandene Niederschlag auf einem Filter gesammelt und in etwas Salzsäure und Wasser gelöst. Hierauf wird der Kalk mittelst Kaliumcarbonat ausgefüllt, das Filtrat eingedampft und kochend heiss mit Chlorbarium gefällt. Der Niederschlag wird nun in Salzsäure gelöst, wobei das bernsteinsaure Barium in Lösung geht, und hierauf mit Schwefelsäure gefällt wird. Aus dem erhaltenen Bariumsulfat ergibt sich die Menge der Bernsteinsäure. Durch die Fällung mittelst Bleiessig dürfte eine vollständige Abscheidung der Bernsteinsäure aus dem Wein kaum gelingen, besonders da das bernsteinsaure Blei im Ueberschuss von Bleiessig löslich ist und sich dann erst allmählich aus dieser Lösung wieder ausscheidet. Durch die Ausfüllung mittelst Bariumchlorid aus kochend heisser Lösung wird sich ferner kaum eine vollständige Trennung von der Aepfelsäure bewerkstelligen lassen.

Die Löslichkeitsverhältnisse der Bernsteinsäure stellen sich nach Bourgoni[1]) folgendermassen:

In 100 Theilen Aether lösen sich 1,265 Theile Bernsteinsäure;

in 100 Theilen absoluten Alkohols lösen sich 7,51 Theile Bernsteinsäure;

in 100 Theilen 90%igen Alkohols lösen sich 12,59 Theile Bernsteinsäure.

Barfoed[2]) gibt für die qualitative Bestimmung folgende Charakteristik der Bernsteinsäure:

Die Salze sind mit Ausnahme der Alkalisalze in Alkohol unlöslich;

1) Bull. soc. chim. de Paris 29. 242.

2) Lehrbuch der organ. qualitativen Analyse.

Bariumchlorid erzeugt bald einen Niederschlag, in 250 Theilen Wasser löslich, in Alkohol unlöslich, in verdünnter Salzsäure löslich; beim Kochen mit Ammoniumchlorid löslich.

Calciumchlorid gibt in concentrirter Lösung einen Niederschlag, in 50 Theilen Wasser löslich, in Alkohol unlöslich; die freie Säure gibt mit Calciumchlorid keinen Niederschlag, ebensowenig das bernsteinsaure Natrium bei Gegenwart von Ammoniumchlorid.

Essigsaures Blei gibt einen, im Ueberschuss des Fällungsmittels löslichen, sich aber bald wieder ausscheidenden Niederschlag; durch Ammoniak wird derselbe nicht gelöst (Unterschied von Weinsäure), sondern in basisches Salz verwandelt; in essigsaurem Ammon ist derselbe leicht löslich, er löst sich selbst in Alkohol.

Eisenchlorid gibt in neutraler Lösung einen Niederschlag von basisch bernsteinsaurem Eisenoxyd, fällt die Säure aber nicht vollständig.

Silbernitrat gibt einen weissen, beim Kochen sich nicht verändernden Niederschlag. Merkuronitrat gibt einen weissen, im Ueberschuss des Fällungsmittels beim Kochen schwer löslichen Niederschlag.

I. Chemische Charakteristik der Bernsteinsäure und Versuche zur quantitativen Bestimmung derselben.

A. Löslichkeitsversuche.

Für die Löslichkeit der Bernsteinsäure in verschiedenen Lösungsmitteln bei 15° Celsius wurden folgende Zahlen gefunden:

In 100 Theilen

wasserfreiern Aether	lösen	sich	1,193	Bernsteinsäure
Alkohol (96 %)	»	»	9,986	»
Alkohol (90 %)	»	»	11,984	»
Methylalkohol	»	»	15,73	»
Aceton	»	»	5,544	»

In Benzol ist die Bernsteinsäure unlöslich. Diese Versuche wurden in folgender Weise ausgeführt:

In ein Kochkölbchen von 50 ccm Rauminhalt wurden 3,0 Bernsteinsäure, die vorher sehr fein gerieben worden war, und ungefähr 15 g von der betreffenden Flüssigkeit gebracht. Dann wurde das Kölbchen gut verkorkt und unter öfterem Umschütteln in einem Wasserbade, dessen Temperatur durch einen Thermostaten beständig auf 15° Celsius gehalten wurde, drei Tage stehen gelassen. Dann wurde die Flüssigkeit in ein vorher gewogenes Becherglas abfiltrirt gewogen, langsam verdunstet und nach dem Verdunsten der Flüssigkeit das Becherglas bei 50° getrocknet und gewogen. Aus den so erhaltenen Zahlen wurde dann die in 100,0 Flüssigkeit sich lösende Menge von Bernsteinsäure berechnet.

B. Versuche über die Löslichkeit der Succinate der schweren Metalle.

Die Fähigkeit der Bernsteinsäure, mit den einzelnen Oxyden der schweren Metalle Verbindungen verschiedener Löslichkeit einzugehen, wurde vor Allem einer eingehenden Prüfung unterzogen, wobei selbstverständlich auch die bekannten Thatsachen in die Versuchsreihe aufgenommen wurden. Zu diesen Versuchen wurde eine vollständig neutrale, 2 %ige Lösung von bernsteinsaurem Natrium hergestellt und dieselbe mit den verschiedenen Metallsalzlösungen vermischt.

Kalkwasser ergab eine Fällung erst nach Zusatz von Alkohol.

Chlorcalcium ergab eine Fällung erst nach Zusatz von Alkohol.

Bariumchlorid ergab eine allmählige Ausscheidung, die durch Zusatz von Alkohol vollständig wurde. Aepfelsäure und Weinsäure werden ebenfalls durch Bariumchlorid aus alkoholischer Lösung gefällt.

Strontiumsulfat ergab selbst nach Zusatz von Alkohol keine Fällung.

Magnesiumsulfat ergab keine Fällung.

Magnesiamischung (d. h. Magnesiumsulfatlösung mit Ammoniumchlorid und Ammoniak versetzt) ergab mit Bernsteinsäure und Aepfelsäure keine Fällung, dagegen wurde Weinsäure gefällt.

Zinksulfat ergab einen weissen Niederschlag.
Cadmiumsulfat ergab einen weissen Niederschlag.
Nickelsulfat ergab keine Fällung.
Mangansulfat ergab keine Fällung.
Eisenchlorid ergab einen voluminösen, rothbraunen Niederschlag.
Aluminiumsulfat ergab einen weissen Niederschlag.
Berylliumsulfat ergab keine Fällung.
Zinnchlorür ergab eine Fällung, auch mit Aepfelsäure und Weinsäure.
Uranacetat ergab eine Fällung.
Kupfersulfat ergab keine Fällung.
Bleihydroxyd schied die Bernsteinsäure aus ihren Lösungen aus.
Bleiacetat ergab eine weisse Fällung.
Quecksilberchlorid ergab keine Fällung.
Quecksilberoxydulnitrat ergab einen flockigen, weissen Niederschlag, auch mit Aepfelsäure und Weinsäure.
Silbernitrat ergab auch mit Aepfelsäure eine weisse Fällung, mit Weinsäure jedoch nur aus concentrirter Lösung.

Das nähere Studium der einzelnen Fällungen lieferte folgendes Ergebniss:

Die Fällungen mit Calciumchlorid und Bariumchlorid nach Zusatz von Alkohol sind bei Bernsteinsäure, Aepfelsäure und Weinsäure vollständig; dieselben nehmen beim Umrühren nach kurzer Zeit fein krystallinische Form an und stellen unter dem Mikroskop gesehen feine Nadeln dar. Die Fällung mit Zinksulfat tritt nur in concentrirter Lösung ein und löst sich bei Zusatz von mehr Wasser wieder auf; ebenso verhält sich die Fällung mit Cadmiumsulfat. Die Fällung mit Aluminiumsulfat ist unvollständig; bei Gegenwart von Aepfelsäure und Weinsäure tritt sie überhaupt nicht ein.

Die Fällung mit Uranacetat wird durch Aepfelsäure und Weinsäure verhindert.

Die Fällung durch Zinnchlorür ist unvollständig.

Bleihydroxyd und Bleiacetat ergaben keine vollständige Ausscheidung der Bernsteinsäure.

Quecksilberoxydulnitrat bewirkt nur eine unvollständige Ausfällung der Säuren.

Silbernitrat fällt die Bernsteinsäure vollständig aus, während Weinsäure nur aus concentrirten Lösungen, Aepfelsäure aber bis zur Verdünnung 1 : 800 noch ausgefällt wird.

Um festzustellen, durch welche Bestandtheile die Fällung der Bernsteinsäure mittelst Eisenchlorid verhindert oder beeinträchtigt werden kann, wurden in folgenden Lösungen quantitative Fällungsversuche mit Eisenchlorid gemacht:

1. 0,3 % ige Lösung von Bernsteinsäure mit 0,5% Zucker;
2. 0,3 % ige Lösung von Bernsteinsäure mit 0,5% Glycerin;
3. 0,3 % ige Lösung von Bernsteinsäure mit 0,2% Aepfelsäure;
4. 0,3 % ige Lösung von Bernsteinsäure mit 0,4% Weinstein.

Lösung 1 ergab hiebei statt 0,3 Bernsteinsäure 0,289;
Lösung 2: 0,293;
Lösung 3: 0,1386, 0,154, 0,2168, 0,203, 0,2168;
Lösung 4: 0,233, 0,1526.

Die grösseren Unterschiede zwischen den einzelnen Resultaten bei 3 und 4 wurden bedingt durch die Art und Weise, wie die Fällung vorgenommen wurde; wenn die Fällung heiss vorgenommen und nach dem Erkalten nach etwa drei Stunden abfiltrirt wurde, wurden viel kleinere Zahlen erzielt, als wenn die Fällung in der Kälte vorgenommen wurde. Durch Zucker und Glycerin wird also die Eisenchloridfällung nicht beeinträchtigt, während Weinsäure und Aepfelsäure einer quantitativen Fällung der Bernsteinsäure mittelst Eisenchlorid Schwierigkeiten in den Weg legen. Schon die Farbe und Beschaffenheit des in den Lösungen 3 und 4 entstehenden Niederschlags zeigte, dass hier keine normale Fällung stattfand, der Niederschlag war von ganz hellbrauner Farbe und flockig; er setzte sich sehr rasch ab, während der aus reinen Lösungen ausfallende Niederschlag von dunklerer Farbe und ziemlich voluminös ist. Da nun eine vollständige Trennung der Bernsteinsäure von Aepfelsäure und Weinsäure nicht möglich ist, und da selbst kleine Mengen der beiden letzteren auf die Eisenfällung störend einwirken, so musste die

Bestimmung mittelst eines anderen Fällungsmittels versucht werden. Es ergab sich nach den obigen Versuchen als das nächstliegende, die Abscheidung und Bestimmung mittelst Silbernitrat vorzunehmen. Zu diesen Probeversuchen wurde ein Kunstwein dargestellt, bestehend aus:

100	Theilen	Alkohol
5	„	Glycerin
5	„	Zucker
2	„	Weinstein
0,5	„	Aepfelsäure
0,5	„	Natriumphosphat
1	Theil	Bernsteinsäure
886	Theilen	Wasser.

Eingehende, zahlreiche Versuche, bei welcher die oben angegebenen Erfahrungen in Betreff der Abscheidung der Bernsteinsäure aus Lösungen Berücksichtigung fanden, führten schliesslich zu folgender Methode, welche sich nicht blos bei diesem Kunstweine, sondern auch bei den natürlichen Weinen, gegohrenen Flüssigkeiten überhaupt, bewährt.

100 ccm Wein werden bis zur Syrupdicke verdampft, wiederholt auf dem Wasserbade mit kochendem Alkohol ausgezogen und der alkoholische Auszug jedes Mal nach dem Erkalten abfiltrirt. Die Auszüge werden vermischt, der Destillation unterworfen und der Destillationsrückstand in wenig heissem Wasser gelöst. Nach dem Erkalten wird die Lösung, wenn sie trüb ist, filtrirt, hierauf mit Bariumnitratlösung und mit dem 3 bis 4fachen Volumen 90%igen Alkohols versetzt und tüchtig umgerührt. Nachdem sich der Niederschlag gut abgesetzt hat, wird er auf ein Filter gebracht, mit 70%igem Alkohol gut ausgewaschen und hierauf eine Zeit lang mit einer genügenden Menge von Natriumcarbonatlösung erwärmt. Die Flüssigkeit wird hierauf abfiltrirt, mit Salpetersäure neutralisirt, auf ein kleines Volumen eingedampft und nach Neutralisation mit Ammoniak mit Magnesiamischung (aus Magnesiumnitrat, Ammoniumnitrat und Ammoniak bestehend) versetzt. Nach 3 bis 4stündigem Stehen wird die Flüssigkeit abfiltrirt, mit Kalilauge erhitzt, bis alles Ammoniak

entfernt ist, hierauf von dem ausgeschiedenen Magnesiumhydroxyd abfiltrirt und mit Salpetersäure ganz genau neutralisirt. Nun wird auf 100 bis 150 ccm verdünnt und mit Sibernitratlösung (1 : 20) gefällt. Der erhaltene Niederschlag wird auf einem tarirten Filter gesammelt, gut ausgewaschen, getrocknet und gewogen. Hierauf wird er zur Kontrole im Porzellantiegel geglüht und als metallisches Silber wieder gewogen. Die aus beiden Wägungen berechneten Resultate müssen übereinstimmen.

Das Chlor, welches in den zu untersuchenden Flüssigkeiten, wie Bier und Wein, enthalten sein kann, wird bei der Fällung mittelst Bariumnitrat in alkoholischer Lösung in Lösung bleiben, wenn nicht zu viel Alkohol zugesetzt wird und wenn man die Flüssigkeit nicht zu lange zum Absitzen bei Seite stellt. Wenn jedoch Letzteres der Fall ist, so enthält die Flüssigkeit noch Chlor, und ist es desshalb dann immer nothwendig, die zur Fällung mit Silbernitrat fertige Lösung auf Chlorgehalt zu prüfen. Ist ein solcher noch vorhanden, so erleidet die Bestimmungsmethode noch eine nothwendige Abänderung, welche darin besteht, dass eine bestimmte Menge der nach Abscheidung der Phosphorsäure und Beseitigung des Ammoniaks erhaltenen Flüssigkeit (25 ccm) zur Trockene verdampft und eingeäschert und in der wässerigen Lösung dieser Asche das Chlor volumetrisch mittelst Rhodanammonium bestimmt wird. Die hier gefundene Chlormenge wird als Silberchlorid berechnet und als solches von dem gefundenen Silbersuccinat in Abzug gebracht.

Die nach obiger Methode in je 100 ccm Kunstwein, entsprechend 0,1 Bernsteinsäure, ausgeführten Bestimmungen ergaben folgendes Resultat:

I	=	0,102	Bernsteinsäure
II	=	0,0987	„
III	=	0,103	„

Für den Bernsteinsäuregehalt verschiedener natürlicher Weine wurden folgende Zahlen gefunden:

Serbischer Rothwein . . . . 0,539 Bernsteinsäure im Liter,
Vino de Chianti . . . . . 0,459 Bernsteinsäure im Liter,

Pfälzer	a) 0,317 b) 0,517	Bernsteinsäure im Liter.
Rheinwein	0,856	» » »
Moselwein	0,392	» » »
Madeira	0,825	» » »
Malaga	0,868	» » »
Marsala	0,675	» » »
Tokayer, gewöhnlich	0,240	» » »
Tokayer, echt, Marke süss	0,763	» » »
Tokayer, echt, Marke herb	1,512	» » »

II. Gährungsversuche.

Versuche über die Bildung der Bernsteinsäure bei der alkoholischen Gährung zuckerhaltiger Flüssigkeiten.

Um nach obiger Methode die bei verschiedenen Bedingungen sich bildenden Mengen von Bernsteinsäure zu bestimmen und mit den nach V. Thylmann und A. Hilger unter denselben Bedingungen gebildeten Mengen von Glycerin zu vergleichen, wurden Gährungsversuche nach folgenden Gesichtspunkten angestellt:

In erster Linie wurden die Gährungen bei drei verschiedenen Temperaturen, 15°, 25°, 35°, vorgenommen, ferner mit oder ohne Luftzutritt; dann wurden verschiedene Zuckerarten, sowie verschiedene Hefesorten angewandt. Endlich wurden noch Versuche mit Unterbrechung der Gährung angestellt, um festzustellen, wie weit die Bildung der Bernsteinsäure bis zu gewissen Zeitabschnitten schon vorgeschritten war.

Die Temperaturen 15° und 25° wurden durch Thermostaten, und die Temperatur von 33—35° in einem Brutkasten genau regulirt.

Die zum Vergähren gebrachten Zuckerarten waren: Feinster Rohrzucker, chemisch reiner Traubenzucker, amerikanischer Traubenzucker und Maltose. Letztere drei waren von H. Trommsdorff in Erfurt bezogen.

Die verwendete Presshefe in reinem stärkefreiem Zustand war mir von Herrn Fabrikant Hellmuth in Buch bei Nürnberg, die reine Normal-Hefe von Herrn Direktor Professer Aubry von der wissenschaftlichen Station für Brauerei in München in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellt worden.

Die Vergährung selbst wurde in folgender Weise vorgenommen:

300 ccm der filtrirten und durch Aufkochen sterilisirten Zuckerlösung wurden in einem vorher sterilisirten und mit Wattepfropf verschlossenen Kolben von etwa einem Liter Inhalt eingefüllt und hierauf die Hefe, mit etwas sterilisirtem Wasser angerührt, zugegossen. Von der Bierhefe wurden auf 300 ccm 15 %ige Zuckerlösung je 50 g, von der Normalhefe je 15 g und von der Presshefe je 20 g zugesetzt. Nun wurde der Kolben wieder mit dem Wattepfropf oder, wenn die Gährung bei Luftabschluss vor sich gehen sollte, mit einer Luftabschlussröhre, die zuvor sterilisirt worden war, verschlossen und bei der betreffenden Temperatur bei Seite gestellt, bis keine Entwickelung von Kohlensäure mehr stattfand. Nun wurde die Flüssigkeit durch Aufkochen am Rückflusskühler sterilisirt, um eine Weiterwirkung der Hefe zu verhindern. Dann wurden 50 ccm der Flüssigkeit zur Bestimmung der Gesammtsäure verwendet, von der übrigen Flüssigkeit wurden 200 ccm abdestillirt und in diesen die Bestimmung von Alkohol und flüchtiger Säure vorgenommen. In dem Destillationsrückstand wurde dann die Bernsteinsäure bestimmt. Von einer genauen Bestimmung der flüchtigen Säuren durch weitergehende Destillation musste abgesehen werden, da in diesem Fall zu leicht ein Verlust an Bernsteinsäure stattfinden konnte. Die erhaltenen Zahlen wurden in die, 100 ccm der ursprünglichen Flüssigkeit = 15 g Zucker, entsprechenden Mengen umgerechnet, um in den Tabellen die Zahlen möglichst übersichtlich anzugeben. Der Alkoholgehalt wurde in Gewichtstheilen, die Gesammtsäure und flüchtige Säure in den, 100 ccm der ursprünglichen Zuckerlösung entsprechenden Mengen von $^1/_{10}$ Normal-Kalilösung ausgedrückt.

Die zu der Gährung gebrauchte Nährflüssigkeit nach Hayduck besteht aus:

25,0 saurem phosphorsaurem Kali
8,5 krystallisirter schwefelsaurer Magnesia
20,0 Asparagin

in Wasser zu einem Liter gelöst.

Von dieser Nährflüssigkeit wurden auf 100 ccm Zuckerlösung je 25 ccm zugesetzt, so dass also je 100 ccm der Flüssigkeit 15 g Zucker und die 25 ccm der Nährflüssigkeit entsprechenden Mengen der Salze der Nährflüssigkeit enthielten.

Die beiden Reihen der unterbrochenen Gährung wurden derart ausgeführt, dass nach der oben beschriebenen Weise in je vier Kolben von einem Liter Inhalt je 300 ccm sterilisirte Zuckerlösung und 20 g Presshefe gegeben wurden. Dann wurde mit Wattepfropf verschlossen und die eine Reihe bei 15°, die andere bei 35° bei Seite gestellt. Nach Ablauf des betreffenden Zeitabschnittes wurde jedesmal ein Kolben herausgenommen, durch Aufkochen am Rückflusskühler sterilisirt und der Inhalt zu den Bestimmungen verwendet.

Die Dauer der Gährung der verschiedenen Zuckerarten war die gleiche; die Gährung bei 35° verlief sehr energisch und rasch, die Gährung bei 25° ging Anfangs auch sehr stark vor sich, verlangsamte sich aber allmählig. Die Gährung bei 15° ging langsam und ziemlich gleichmässig vor sich. Luftabschluss oder Luftzutritt war nicht von Einfluss auf die Dauer der Gährung. Der Zusatz von Nährstoffen beschleunigte die Gährung.

Von den verschiedenen Hefesorten bewirkte die Presshefe die rascheste Vergährung, etwas weniger stark wirkte die Normalhefe; am langsamsten ging die Gährung bei der Bierhefe vor sich.

Die mittelst Bierhefe vorgenommenen Gährungen weisen in ihrem Alkoholgehalt keine erheblichen Unterschiede auf, am geringsten ist der Alkoholgehalt bei der Vergährung von Rohrzucker bei 15°, wo offenbar noch nicht aller Zucker umgewandelt war. Im Uebrigen ist der Alkoholgehalt bei Luftabschluss immer etwas

grösser, was ja auch leicht zu erklären ist, da bei Luftzutritt sich immerhin etwas Alkohol verflüchtigen kann.

Der Zusatz von Nährflüssigkeit hat eine Erhöhung des Alkoholgehalts nicht zur Folge.

Die Gesammtsäure ist bei den höheren Temperaturen wesentlich vermehrt, durch die Nährflüssigkeit tritt keine Vermehrung ein.

In dem Gehalt an flüchtiger Säure treten keine wesentlichen Unterschiede auf.

Der Gehalt an Bernsteinsäure zeigt keine grossen Abweichungen; weder die Anwendung verschiedener Zuckerarten, noch verschiedener Temperaturen, noch auch die Vergährung bei Luftzutritt oder Luftabschluss, sowie mit oder ohne Nährflüssigkeit scheinen die Bildung der Bernsteinsäure wesentlich zu beeinflussen.

Bei der Vergährung mit reiner Normalhefe treten weder bei der Alkoholbildung noch bei der Bernsteinsäurebildung erhebliche Unterschiede auf.

Bei der Vergährung mit Presshefe bildeten sich ziemlich gleiche Mengen von Alkohol; dagegen erscheint bei der Gesammtsäurebildung bei 35° eine bedeutende Vermehrung gegenüber der Gesammtsäure bei 15°. Auch die flüchtige Säure erfuhr bei 35° eine starke Vermehrung. Die Mengen von Bernsteinsäure zeigen keine grossen Unterschiede. Eine Vermehrung der Bernsteinsäure gegenüber der ersten Gährungsreihe mit Presshefe trat bei den Gährungsversuchen mit unterbrochener Gährung auf, zu welchen eine neue Menge Presshefe bezogen worden war. Der Alkohol- und Säuregehalt stand auch hier im Einklang mit den vorhergehenden Ergebnissen.

Die Vergleichung der gesammten Ergebnisse der Gährungsversuche zeigt, dass der Alkoholgehalt durch die verschiedenen Hefesorten nicht wesentlich beeinflusst wird. Der Gehalt an Gesammtsäure und flüchtiger Säure ist bei Anwendung von Presshefe ein bedeutend höherer als bei Anwendung von Bierhefe. Die Bildung von Bernsteinsäure wird durch Normalhefe und Presshefe gegenüber der Bierhefe ziemlich vermehrt. Es darf also wohl angenommen werden, dass eine energische Thätigkeit

der Hefe auch eine vermehrte Bildung von Bernsteinsäure bedingt.

Die Versuche mit unterbrochener Gährung beweisen, dass die Bildung der Bernsteinsäure mit der Bildung des Alkohols und also die Zersetzung des Zuckers gleichmässig Hand in Hand geht; bei 35° verhält sich allerdings bei der ersten Unterbrechung der Alkohol zur Bernsteinsäure wie 100 : 0,439, die drei anderen Unterbrechungen zeigen aber das Verhältniss 100 : 0,875; 100 : 0,89; 100 : 0,823. Bei der Gährung bei 15° wird sich das Verhältniss nach den gefundenen Bernsteinsäuremengen wohl ähnlich gestalten.

Wenn diese Resultate mit den von V. Thylmann und A. Hilger bei der Glycerinbildung erhaltenen verglichen werden, so lassen sich folgende Sätze aufstellen:

1. Die Bernsteinsäurebildung wird durch niedere Temperaturen nicht verringert, während bei der Glycerinbildung durch niedere Temperaturen eine Verringerung eintritt.

2. Die Bernsteinsäurebildung wird durch Zusatz von Nährstofflösung nicht vermehrt; bei der Glycerinbildung ist durch Nährstofflösung in der Regel eine starke Vermehrung zu beobachten.

3. Es ist weder auf die Bildung von Bernsteinsäure, noch auf die Bildung von Glycerin von Einfluss, ob die Gährung bei Luftzutritt oder Luftabschluss stattfindet.

4. Durch eine energischere Wirkung der Hefezellen wird im Allgemeinen eine Vermehrung der Bildung von Bernsteinsäure bewirkt.

Da nun nach der von Pasteur aufgestellten Formel unter allen Bedingungen korrespondirende Mengen von Bernsteinsäure und Glycerin gebildet werden müssten, was aber nach Satz 1 und 2 nicht der Fall ist, so ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die Bernsteinsäure sich unabhängig von der Glycerinbildung als normales Product der Thätigkeit der Hefe bei der alkoholischen Gährung zuckerhaltiger Flüssigkeiten bildet und also die von Pasteur aufgestellte Formel für die Spaltung von Zucker in Glycerin, Bernsteinsäure und Kohlensäure nicht ganz einwurfsfrei sein dürfte.

Bierhefe.

		Ohne Nährstoffe						Mit Nährstoffen 25 ccm Hayduck's Nährflüssigkeit in 100 ccm Lösung	
		15° Dauer der Gährung: 10 Tage		25° Dauer der Gährung: 3 Tage		35° Dauer der Gährung: 2 Tage		25° Dauer der Gährung: 2 Tage	
		Luftzutritt	Luftabschl.	Luftzutritt	Luftabschl.	Luftzutritt	Luftabschl.	Luftzutritt	Luftabschl.
Lösung von Rohrzucker 15% 300 ccm Bierhefe 50 gr	Alkohol Gew.-Theile in 100 ccm Flüssigkeit = 15,0 Zucker	6	6,33	7,408	7,785	7,41	7,70	6,795	7,875
	Gesammt-Säure — ccm $^1/_{10}$ Normal-Kali auf 100 CC Flüssigkeit	25,2	24	33,6	31,2	34,8	32,4	30,7	29,3
	Flüchtige Säure — ccm $^1/_{10}$ Normal-Kali auf 100 CC Flüssigkeit	2,7	2,4	2,38	2,1	2,62	2,1	2,1	1,8
	Bernsteinsäure in 100 ccm Flüssigkeit = 15,0 Zucker	0,04132	0,0384	0,0396	0,0394	0,0402	0,0421	0,0414	0,0416
Lösung von Maltose 15% 300 ccm Bierhefe 50 gr	Alkohol Gew.-Theile in 100 ccm Flüssigkeit = 15,0 Maltose			6,72	7,43	6,8	7,44		
	Gesammt-Säure — ccm $^1/_{10}$ Normal-Kali auf 100 CC Flüssigkeit			27,9	26,6	31,2	30,6		
	Flüchtige Säure — ccm $^1/_{10}$ Normal-Kali auf 100 CC Flüssigkeit			3,2	2,9	2,9	2,85		
	Bernsteinsäure in 100 ccm Flüssigkeit = 15,0 Maltose			0,0332	0,0383	0,0384	0,0364		
Lösung von amerikanischem Traubenzucker 15% 300 ccm Bierhefe 50 gr	Alkohol-Gew. Theile in 100 ccm Flüssigkeit=15,0 Traubenzucker	6,87	7,01	6,5	7,46	7,305	7,5		
	Gesammt-Säure — ccm $^1/_{10}$ Normal-Kali auf 100 CC Flüssigkeit	22,3	20,8	25,2	24,6	31,2	30,6		
	Flüchtige Säure — ccm $^1/_{10}$ Normal-Kali auf 100 CC Flüssigkeit	2,2	2,1	3,2	2,9	3,1	2,7		
	Bernsteinsäure in 100 ccm Flüssigkeit = 15,0 Traubenzucker	0,0362	0,0373	0,0416	0,0404	0,0356	0,0344		

Ohne Nährstoffe.

		Reine Hefe			Presshefe									
					Unterbrochene Gährung									
		15°		35°	15°	35°	15°				35°			
		Dauer der Gährung: 7 Tage		Dauer der Gährung 2 Tage	Dauer der Gährung		Nach				Nach			
		Luftzutritt	Luftabschl.	Luftzutritt	6 Tage Luftzutritt	2 Tage Luftzutritt	24 Std.	48 Std.	4 Tgn.	6 Tgn. Luftzutritt	5 Std.	10 Std.	24 Std.	48 Std. Luftzutritt
Lösung von chemisch reinem Traubenzucker 15% 300 ccm. Reine Hefe 15,0 bezw. Presshefe 20 gr	Alkohol-Gew. Theile in 100 ccm Flüssigkeit = 15,0 Zucker	6,88	7,02	6,46	7,14	6,98					2,56	5,2	6,158	7,05
	Gesammt-Säure — ccm $^1/_{10}$ Normal-Kali auf 100 ccm Flüssigkeit				28,6	52,6					16,5	24	32,5	46,5
	Flüchtige Säure — ccm $^1/_{10}$ Normal-Kali auf 100 ccm Flüssigkeit				3,3	6,3					0,8	0,95	1,2	2,3
	Bernsteinsäure in 100 ccm Flüssigkeit = 15,0 Zucker	0,04595	0,04675	0,04361	0,04290	0,04339	0,0246	0,05273	0,0631	0,06482	0,01125	0,0455	0,05486	0,05792
Lösung von amerikanischem Traubenzucker 15% 300 ccm. Presshefe 20 gr	Alkohol-Gew. Theile in 100 ccm Flüssigkeit = 15,0 Zucker				7,14	6,93								
	Gesammt-Säure — ccm $^1/_{10}$ Normal-Kali auf 100 ccm Flüssigkeit				28,3	49,1								
	Flüchtige Säure — ccm $^1/_{10}$ Normal-Kali auf 100 ccm Flüssigkeit				3,6	5,1								
	Bernsteinsäure in 100 ccm Flüssigkeit = 15,0 Zucker				0 04661	0,04373								
Lösung von Rohrzucker 15% 300 ccm. Presshefe 20 gr	Alkohol-Gew. Theile in 100 ccm Flüssigkeit = 15,0 Zucker				7,59	7,44								
	Gesammt-Säure — ccm $^1/_{10}$ Normal-Kali auf 100 ccm Flüssigkeit				29,2	46,4								
	Flüchtige Säure — ccm $^1/_{10}$ Normal-Kali auf 100 ccm Flüssigkeit				3,8	5,1								
	Bernsteinsäure in 100 ccm Flüssigkeit = 15,0 Zucker				0,05149	0,0467								